

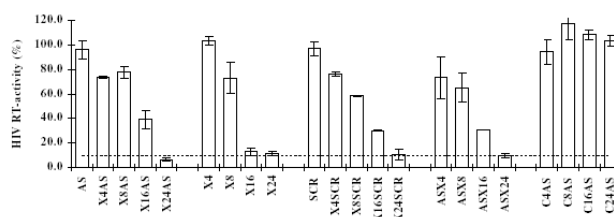
A T 38163 számú OTKA pályázatunk keretében végzett munka részben publikált (3 közlemény; IF összesen: 9.284), részben publikálás alatt van és részben 1.5 éven belül publikálva lesz.

Munkánk kiindulópontja volt az a korábbi megfigyelésünk, hogy a laboratóriumunk-ban kifejlesztett oligonukleotid szerkezetű reverz transzkriptáz inhibitor gátolja a telomeráz enzimet is (Anal Biochem. Szatmari et al. 2000; 282:80-8). A gátló oligonukleotid egy 35mer homooligonukleotid, mely kizárólag 4-tio-dezoxiuridilátból épül fel: $(s^4dU)_{35}$. A vegyület nem-szekvencia specifikus hatása jelzi, hogy itt a telomeráz protein alegysége lép kölcsönhatásba a gátló oligonukleotiddal. Elképzelésünk, jelen pályázat egyik fontos pontja, ezt a nemspecifikus hatást, a vegyület átalakításával, egy telomerázra specifikus oligonukleotiddá alakíthatani. Ezt úgy kívántuk elérni, hogy egy 4-tio-oligo-dezoxiuridilátból álló nukleotid szakaszt (mely egy protein-komponenssel interakcióba lépő oligonukleotid) összekapcsoljunk egy antiszensz szakasszal, mely a telomeráz (ribonukleoprotein) RNS komponensének templát régióját ismeri fel. A vegyületek szintézisét megoldottuk két féle úton:

1. Olyan oligonukleotidokat kezeltünk folyékony kénhidrogénnel 55°C-on melyek egy antiszensz szakaszból (AGTTAGGGTTAGA) és az 5' vagy 3' végén egy $(dC)_n$ szakaszból álltak. Az antiszensz szakasz nem tartalmazott citidilátot ezért változatlan maradt, a $(dC)_n$ szakasz pedig 4-tio-uridiláttá alakult kvantitatíve.
2. Előállítottuk a 4-tio-uridilát foszfoamiditjét, melyet közvetlenül fel lehetett használni automata oligonukleotid szintetizátorban módosítatlan amiditekkal együtt a kívánt szekvencia szintézisére.

A szintézissel kapcsolatos részleteket és analitikát (szerves kémiai szintézisek, MS) korábbi részjelentéseinkben bemutattuk. A második, egyébként sokkal költségesebb, módszer kidolgozására azért volt szükség, hogy az oligonukleotidok fluoreszcensen jelzett változatait is el tudjuk készíteni.

Az I. táblázatból látszik hogy az antiszensz oligonukleotid telomeráz gátló aktivitása jelentősen emelkedik ha egy rövid tiolált nukleotid szakaszt kötünk a molekula 5' végére, ugyanakkor a 3' végre kapcsolt tiolált szakasz csökkenti a gátló aktivitást ha nem túl hosszú. A hosszabb, 24 tagú tiolált szakasz ismét megemeli a molekula aktivitását. Kiderült az is, hogy ha az antiszensz rész bázisrendjét megváltoztatjuk az oligonukleotid gátló hatása megszűnik, kivéve ha hosszú tiolált szakasz kapcsolódik hozzá. Ezek az eredmények és a kontrollként használt antiszensz nélküli tiolált oligonukleotidok $[(s^4dU)_n; n=4-24]$ aktivitása, összhangban elképzelésünkkel, azt valószínűsítik, hogy az antiszensz szakasz kapcsolatba lép a telomeráz RNS templát régiójával az 5' végi tiolált oligonukleotid pedig a telomeráz enzim protein alegységének feltételezett primer kötő-helyére kapcsolódik. Ha hosszabb a tiolált szakasz (24mer) a nem szekvencia specifikus hatás érvényesül. Ezt igazolta az egyes oligonukleotidok hatása HIV reverz transzkriptázra. Az eredményeket az alábbi ábrán mutatom be.



Tárkányi et al. FEBS Lett. 2005.

Table 1
Inhibition of telomerase by oligonucleotides

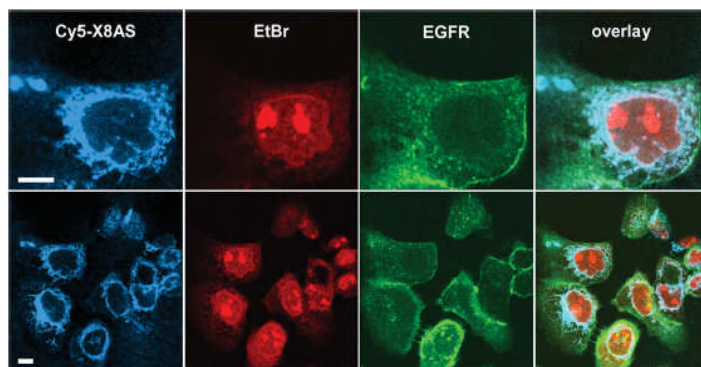
Name	Sequence	IC ₅₀ ± SD (nM)
AS	AGTTAGGGTTAGA	174.2 ± 14.1
(X) ₄ AS	(s ⁴ dU) ₄ AGTTAGGGTTAGA	134.2 ± 16.9
(X) ₈ AS	(s ⁴ dU) ₈ AGTTAGGGTTAGA	38.2 ± 12.4
(X) ₁₆ AS	(s ⁴ dU) ₁₆ AGTTAGGGTTAGA	24.0 ± 3.6
(X) ₂₄ AS	(s ⁴ dU) ₂₄ AGTTAGGGTTAGA	24.3 ± 3.6
AS(X) ₄	AGTTAGGGTTAGA(s ⁴ dU) ₄	292.4 ± 10.6
AS(X) ₈	AGTTAGGGTTAGA(s ⁴ dU) ₈	308.1 ± 13.7
AS(X) ₁₆	AGTTAGGGTTAGA(s ⁴ dU) ₁₆	112.4 ± 25.5
AS(X) ₂₄	AGTTAGGGTTAGA(s ⁴ dU) ₂₄	31.3 ± 13.5
(X) ₄	(s ⁴ dU) ₄	>4000
(X) ₈	(s ⁴ dU) ₈	2974.1 ± 365.6
(X) ₁₆	(s ⁴ dU) ₁₆	310.9 ± 76.0
(X) ₂₄	(s ⁴ dU) ₂₄	116.6 ± 8.1
SCR	GTGATGATGATGA	>4000
SCR(X) ₄	GTGATGATGATGA(s ⁴ dU) ₄	2127.1 ± 509.9
SCR(X) ₈	GTGATGATGATGA(s ⁴ dU) ₈	154.4 ± 19.6
SCR(X) ₁₆	GTGATGATGATGA(s ⁴ dU) ₁₆	65.7 ± 9.2
SCR(X) ₂₄	GTGATGATGATGA(s ⁴ dU) ₂₄	25.3 ± 11.3
(C) ₄ AS	(C) ₄ AGTTAGGGTTAGA	2760.1 ± 617.4
(C) ₈ AS	(C) ₈ AGTTAGGGTTAGA	>4000
(C) ₁₆ AS	(C) ₁₆ AGTTAGGGTTAGA	— ***
(C) ₂₄ AS	(C) ₂₄ AGTTAGGGTTAGA	417.1 ± 66.2
(X) ₈ ASsp	(s ⁴ dU) ₈ AGTTAGGGTTAGA spacer	28.3 ± 5.1

Shown are synthesized chimeras with 3' or 5' (s⁴dU)_n and respective controls.

***telomerase activity was elevated by C₁₆AS.

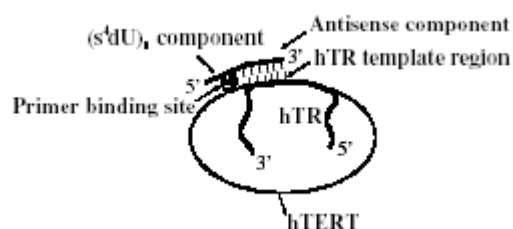
Tárkányi et al. FEBS Lett. 2005

Előállítottuk az X₈AS (X= 4-tio-dU) szerkezetű inhibitor Cy5-jelzett fluoreszcens változatát és ezzel tanulmányoztuk az oligonukleotid bejutását A431 sejtekbe lipofektamin jelenlétében. A konfokális lézer scanning mikroszkópiás képet az alábbiakban mutatom be.



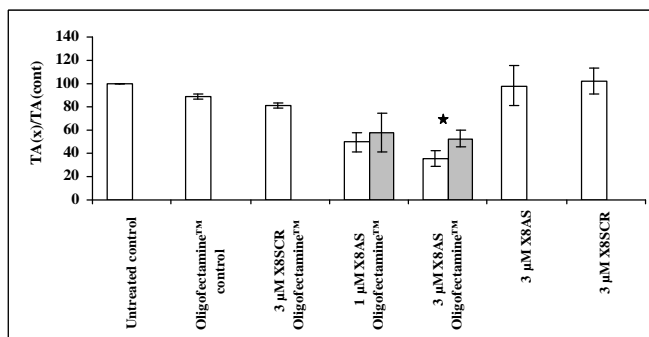
Tárkányi et al. FEBS Lett. 2005.

A következő ábra a telomeráz inhibitorok valószínű működési mechanizmusát mutatja be.



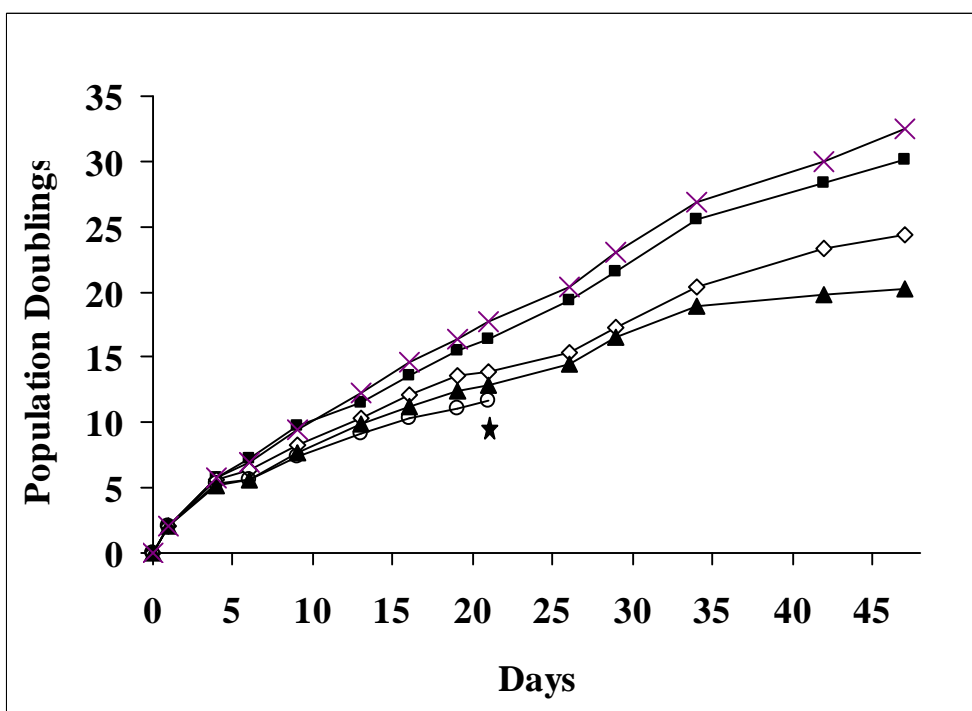
Tárkányi et al. FEBS Lett. 2005.

A telomeráz inhibitorok közül az X₈AS szerkezetűt választottuk ki további vizsgálatra. Ez a molekula kellően aktív és specifikus. 293T sejt kultúrát használtunk kísérleti modelként mert ez jól transzfektálható és rövid valamint hosszabb telomerrel rendelkező változata is létezik. A sejt extraktban mértük a telomeráz aktivitást a transzfekció után 24 (üres oszlopok) és 72 órával (szürke oszlopok).



Nem publikált eredményünk.

Ezután 1 és 3 μM koncentrációban transzfektáltuk az X₈AS-et minden második vagy harmadik nap a sejt kultúrába, melyet folyamatosan fenntartottunk. Az eredmények a következő ábrán láthatóak:



Nem publikált eredményünk.

A 3 μM telomeráz inhibitorral transzfektált sejt a 21. napon kipusztult (üres körök; *-al jelölve). A kezelés első szakaszában nem volt megkülönböztethető a kontrolaktól. Az 1 μM telomeráz inhibitorral kezelt sejtek (fekete háromszög) szaporodása szintén fokozatosan lelassult majd 40 nap után leállt. Ezek az eredmények jó összhangban vannak egy telomeráz inhibitorral várható hatásgörbével. Az eredményeket további kontrollokkal és telomer hossz csökkenésével meg kell erősítenünk.

Az (s⁴dU)₃₅ korábban kimutatott reverz transzkriptáz gátló hatása, valamint a hosszú tiolált részt tartalmazó telomeráz inhibitorok reverz transzkriptáz gátló aktivitása alapján feltételeztük, hogy a (s⁴dU)₃₅ gátolhatja a HIV replikációját. Valóban kiderült, hogy a vegyület anti-HIV hatású, vad típusú és gyógyszer rezisztens törzsek replikációját is gátolja. Az eredményeket a következő táblázatban mutatom be.

Antiviral activity of (s ⁴ dU) ₃₅					
Virus isolate	Resistant to	IC ₅₀ ^a (s ⁴ dU) ₃₅ (μg/ml)	TC ₅₀ ^b	TI ^c TC ₅₀ / IC ₅₀	Fold resistance IC _{50mutant} / IC _{50wild type}
<i>Wild type</i>					
RF		0.8	>50	>62	
IIIB		4.4	>100	>23	
NL4-3		7.8	>100	>13	
<i>NL4-3 mutant</i>					
K103N	NNRTI	25.4	>100	>4	Sensitive; 3.3
Y181C	NNRTI	6.7	>100	>15	Sensitive; 0.9
4X AZT ^d	NRTI	24.5	>100	>4	Sensitive; 3.1
<i>IIIB mutant</i>					
DPS-R ^e	NNRTI	10.5	>100	>10	Sensitive; 2.4

^a 50% inhibition of virus replication.
^b 50% reduction in cell viability.
^c In vitro therapeutic index.
^d Contains mutations D67N, K70R, T215Y and K219Q to express complete resistance to AZT.
^e Generated by in vitro selection against diphenylsulfone (Buckheit et al., 1995b).

Horváth et al. Virology 2005

Az antivirális hatás akkor volt erős ha a vírus-infekcióval egy időben vagy hamarabb adtuk az inhibitorot a sejt kultúrához. Továbbá megállapítottuk, hogy a rövidebb lánchosszú molekulák kevésbé jó inhibitorai a HIV replikációnak. A molekula gátló hatásának vizsgálata arra a meglepő eredményre vezetett, hogy az (s⁴dU)₃₅ nem a reverz transzkriptáz gátlása útján fejt ki anti-HIV aktivitását, hanem rendkívül potens gátlószere a vírus adszorpciójának és bejutásának (2-3 ng/ml) a sejtbe. Ez magyarázta azt, miért kellett az inhibitorot az infekció előtt adni, erős gátló hatás eléréséhez. Az eredményeket a következő táblázat foglalja össze (kontrollként „Chicago Sky Blue”-t használtunk).

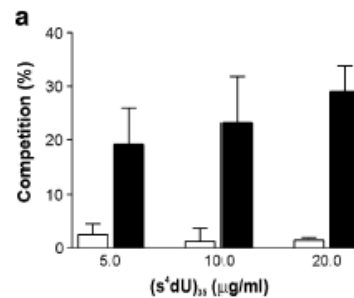
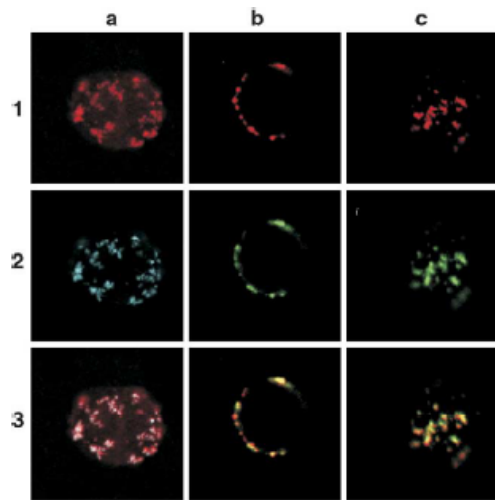
Assessment of (s ⁴ dU) ₃₅ for inhibition of virus-cell attachment, entry and fusion						
	IC ₅₀ ^a (s ⁴ dU) ₃₅ (μg/ml)	TC ₅₀ ^b	TI ^c	IC ₅₀ ^a	TC ₅₀ ^b	TI ^c
	Chicago Sky Blue (μg/ml)					
Virus cell association	0.003	>100	>33,000	1.20	>10	>8.3
Virus entry	0.002	>100	>50,000	0.04	>10	>250
Cell-cell fusion	8.750	>100	>12	0.67	>10	>15

^a 50% inhibition of virus replication.
^b 50% reduction in cell viability.
^c In vitro therapeutic index.

Horváth et al. Virology 2005.

A molekula fluorescens változata (Cy3 és Cy5 jelzést használtunk) a sejtfelszín jól definiált helyeihez kötődik és kolokalizál a vírus bejutásához szükséges sejtfelszíni tioredoxinnal,

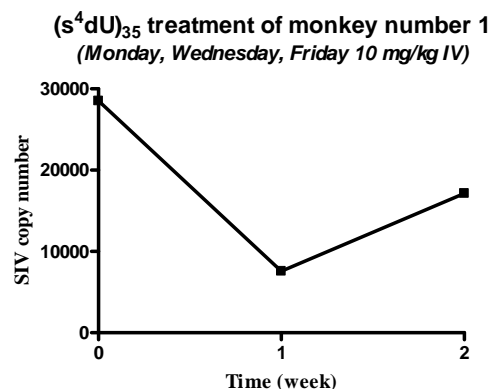
továbbá kompetícióba lép a CD4 receptor ellenes antitestel (fekete oszlopok), de nem kompetál a CD48 ellenes antitestel (üres oszlopok). Publikált eredményeinket az alábbi két ábrán mutatom be.



Horváth et al. Virology 2005.

Kiderült az is, hogy a molekula mintegy 40X stabilisabb a kiinduló vegyületként használt (dC)₃₅-nél és 180 µg/ml koncentrációban sem toxikus humán csontvelő sejtekre.

Az (s⁴dU)₃₅ molekula részletes *in vivo* vizsgálatára nem volt lehetőségünk. Kooperációban mégis sikerült megoldanunk tesztelését két SIV-el fertőzött majomban. A majmok két héten keresztül hétfőn szerdán és pénteken kaptak intravénásan az anyagból 10 mg/testsúly kg koncentrációban. A vírus kópiaszám minden hétfőn meg lett határozva. Kezelés előtt és után a vér teljes analízise megtörtént. A vírus kópiaszám, mindkét majomnál, az első héten drasztikusan csökkent, majd a második héten emelkedett. Tekintve, hogy egy hét kezelés alatt nem alakulhatott ki rezisztencia és a két különböző mértékben fertőzött (a kiinduló kópiaszám más volt) majomnál a vírus kópiaszám azonosan alakult felvetődik valamilyen szisztematikus kísérleti hiba lehetősége. Érdekes, fontos eredménye kísérletünknek az, hogy a vér legrészletesebb analízise sem tudott kimutatni semmilyen toxikus hatást a kéthetes kezelés után. A következő ábrán az 1. számú majomban mért vírus kópiaszám változást mutatom be:



Nem publikált eredményünk.

A fentebb bemutatott vizsgálatokhoz nagytisztaságú kémiaiag erősen módosított oligonukleotidokra volt szükség preparatív mennyiségben. Ezek előállítását laboratóriumunkban egy Gene Assembler Plus oligonukleotid szintetizátorral végeztük. A vegyületek tisztítására anioncserélő kromatográfiát kívántunk alkalmazni, mert ez alkalmas nagymennyiségű oligomer tisztítására. Hátránya, hogy az oligonukleotidot magas sókoncentrációjú oldatban kapjuk meg, melyből izolálni kell. További nehézséget okozott, hogy a hosszú 4-tio-oligodezoxiuridilát tartalmú oligomereket valamint a phosphorothioate internukleotid kötést tartalmazó oligomereket nem lehetett eluálni Resource Q (Pharmacia) anioncserélő oszlopról még tömény NaCl vagy KCl oldattal sem. Ezért megfelelő kromatográfiás módszert kellett kidolgoznunk az oligonukleotid telomeráz inhibitorok tisztítására. Ideális eluensnek bizonyult a Na-perklorát (NaClO_4). Ez a só fele akkora koncentrációban eluálta az oligonukleotidokat mint az NaCl. És azok az oligomerek is tisztíthatók voltak segítségével, melyek egyébként semmilyen más oldattal nem eluálhatóak szobahőfokon. További előnye volt a NaClO_4 -nak, hogy az oligonukleotidok egyszerű acetonos kicsapással sómentes formában kinyerhetők, mert a NaClO_4 kitűnően oldódik acetonban. Az alábbiakban két ábrát mutatok be a módszer hasznosságának igazolására.

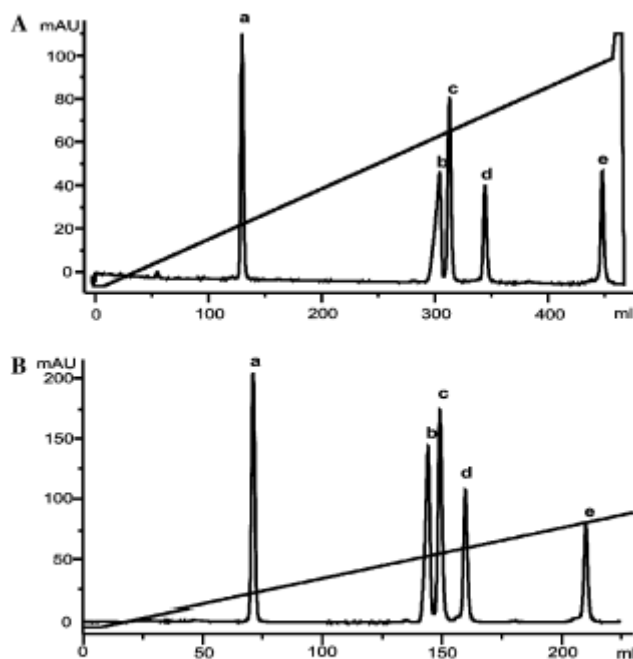


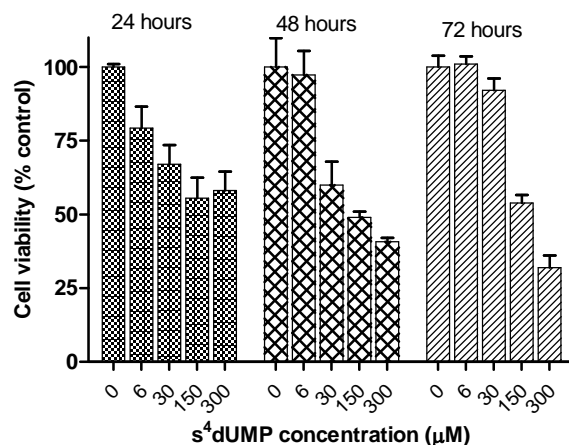
Fig. 1. Purification of a 4-mer (GTCT, peak a), two 10-mers (AGCC TAACAA, peak b, and AGGTGAGAGA, peak c), a 12-mer (CGC GCCCGCGC, peak d), and a 17-mer (AAAAGGCGCGGGC GCG, peak e) of oligodeoxyribonucleotides on anion exchange column with NaCl (A) and NaClO_4 (B) gradient.

Horváth & Aradi, Anal. Biochem. 2005

A kéntartalmú oligonukleotidok degradációs termékeinek hatását vizsgálva kiderült, hogy az $s^4\text{dUMP}$ és $s^4\text{UMP}$ egyaránt apoptózist indukál tumor sejtekben és ezzel párhuzamosan drasztikus telomeráz aktivitás csökkenést eredményez. Az $s^4\text{UMP}$ 6 μM koncentrációban (2 $\mu\text{g/ml}$) 24 óra alatt az eredeti 76%-ára csökkenti a viabilitást, de a telomeráz aktivitás csak

38%-a a kezeltlen sejtekben mért értéknek, azonos mennyiségű proteinre vonatkoztatva (nem publikáltuk).

Az alábbiakban bemutatjuk az s^4 UMP sejtvitalitás csökkentő hatását OCM1 uveális melanoma sejteken.



Nem publikált eredményünk.

Jelen pályázat eddigi eredményeit fenti összefoglalónkban mutattuk be. Néhány eredményünk publikálása még nem történt meg. Nem írtuk le, de vizsgálataink folyamatban vannak, a telomeráz inhibitorok sejteken kifejtett hatását. Itt fontos megmérni a telomer hossz csökkenését és érdekes eredmény lehet a 3' vég túlnyúló szakaszának változását is detektálni. Az előzőekben bemutatott ábra jelzi, hogy az X_8 AS szerkezetű inhibitor sejthalált indukál kb. három hét kezelés után. A specifikus hatás csak úgy igazolható, ha megmérjük a telomer hossz változását a kezelés hatására. Érdekes eredmény az, hogy a 4-tio-uridilát, mely egy mononukleotid, csökkenti a sejtvitalitást és a telomeráz aktivitást. A vegyület nem jut át a sejtmembránra, valószínűleg valamelyik (vagy több) szignál utvonala működését befolyásolja azáltal, hogy enol formája interakcióba lép sejtfelszíni –SH csoportokkal, –SH enzimekkel (pl. sejtfelszíni protein diszulfid izomeráz). A protein diszulfid izomerázra kifejtett hatását nem tudtuk igazolni, mert a vegyület kapcsolatba lép az enzim –SH tartalmú szubsztrátjaival is. Kimutattuk viszont azt, hogy gátolja a gliceraldehid foszfát dehidrogenázt, mely egy esszenciális –SH csoportot hordoz aktív centrumában. Azt, hogy a sejtvitalitás csökkentő hatás milyen mechanizmussal csökkenti a telomeráz aktivitást még nem tudjuk. Ezek a vizsgálatok részben ennek a pályázatnak a keretében remélhetőleg befejezésre kerülnek.

Az X_n AS szerkezetű ($X = s^4$ dUMP) oligonukleotidok tiolált szakasza kölcsönhatásba lép a telomeráz reverz transzkriptáz feltételezett primer kötő helyével. A 4-tio-uridilát 320 nm-es fény hatására kovalensen kötődik proteinekhez. Így várható, hogy a telomerázt X_n AS szerkezetű inhibitorral gátolva és 320 nm-es fénnel megvilágítva a telomeráz protein feltételezett primer kötő helyét meg tudjuk jelölni és meg tudjuk határozni. A telomeráz teljes kristályszerkezete nincs publikálva így a primer kötő hely elsődleges szerkezetének megállapítása kiméra oligonukleotidokkal a kutatás folytatásának egyik iránya lehet (az N-terminal domen szerkezete ismert; Jacobs et al. Nature Structural & Molecular Biology published online 2005 december).

Még három publikáció várható az év folyamán melyeket jelen pályázat támogathat.